

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



RECEIVED	
20 FEB 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 58 674.8

Anmeldetag: 13. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Sunyx Surface Nanotechnologies GmbH,
50933 Köln/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers
für die MALDI-Massenspektrometrie

IPC: G 01 N, B 01 L

Best Available Copy

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Klostermeyer

Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers für die MALDI-Massenspektrometrie

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers mit einer Vielzahl von MALDI-Matrix-Punkten, ein Flächengebilde erhältlich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie ein langzeitstabiles Flächengebilde.

Für die Analyse von Proben beispielsweise in der Wirkstoffchemie oder in der biologischen Forschung und Produktion hat sich vermehrt die Massenspektrometrie durchgesetzt. Für die Analyse von in den Proben befindlichen Biomolekülen wird vorzugsweise die Massenspektrometrie mit Ionisierung durch Matrix-unterstützte Laserdesorption und Ionisierung (MALDI) eingesetzt.

Bei dem MALDI-Verfahren werden insbesondere Biomoleküle und/oder biologisches Material in Form eines Flüssigkeitstropfens auf einen sogenannten MALDI-Matrix-Punkt dosiert, beispielsweise pipettiert, und getrocknet. Die sich dabei bildenden Kristalle werden beispielsweise mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer im linearen- oder im Reflektor-Betrieb untersucht. Details zu diesem Verfahren können Nordhoff et. al. „MALDI-MS as a new method for the analysis of nucleic acid (DNA and RNA) with molecular masses up to 150,000 Dalton, Application of modern mass spectrometric methods to plant science research, Oxford University press, (1996) Seite 86- 101 entnommen werden, das hiermit als Referenz eingeführt wird und somit als Teil der Offenbarung gilt.

Die MALDI-Matrix-Punkte werden gemäß dem Stand der Technik erzeugt, indem die Matrix-Substanz als Lösung in Form eines Flüssigkeitstropfens auf einen Probenträger aufgebracht und dort getrocknet wird. Insbesondere bei Serienversuchen, bei denen teilweise mehr als 200 MALDI-Matrix-Punkte auf den Probenträger aufgebracht werden müssen, ist dieses Verfahren trotz Automationstechniken sehr aufwendig. Darüber hinaus sind die MALDI-Matrix-Punkte in ihrer Form nicht gleichmäßig und in sich nicht homogen. Weiterhin ist die Position der Matrix-Punkte auf dem Probenträger relativ ungenau. Um ein Ineinanderlaufen zweier benachbarter Punkte zu verhindern, muß deren Abstand entsprechend groß gewählt werden.

Es stellt sich deshalb die Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung eines Flächengebildes mit einer Vielzahl von MALDI-Matrix-Punkten zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist.

Gelöst wird die Aufgabe erfindungsgemäß mit einem Verfahren zur Herstellung eines Flächengebildes, vorzugsweise eines Probenträgers, mit einer Vielzahl von MALDI-Matrix-Punkten, bei dem die MALDI-Matrix-Punkte durch Niederschlag der MALDI-Matrix-Substanz aus der Gasphase auf den Probenträger aufgetragen werden.

Es war für den Fachmann überaus erstaunlich und nicht zu erwarten, dass es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gelingt, eine beliebige Anzahl von MALDI-Matrix-Punkten gleichzeitig zu erzeugen. Die MALDI-Matrix-Punkte können eine beliebige Form aufweisen. Sie sind sehr gut reproduzierbar herstellbar, sehr homogen und weisen eine Oberflächenstruktur auf, mit der sich sehr gute Massenspektren erzielen lassen.

Ein Flächengebilde im Sinne der Erfindung ist jeder beliebige Formkörper mit einer beliebig gestalteten Oberfläche. Vorzugsweise ist das Flächengebilde jedoch eine Platte mit einer ebenen Oberfläche, ganz besonders bevorzugt ein Probenträger, der jedoch vorzugsweise keine Einbuchtungen aufweist. Am meisten bevorzugt ist das erfindungsgemäße Flächengebilde eine Folie.

Ein MALDI-Matrix-Punkt im Sinne der Erfindung besteht im wesentlichen aus mindestens einer dem Fachmann geläufigen MALDI-Matrix-Substanz. Bevorzugte MALDI-Matrix-Substanzen sind 3-Hydroxypicolinsäure, α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Sinapinsäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon Nitrobenzylalkohol, Nikotinsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, 2-Aminobenzoessäure, Picolinsäure, 3-Aminobenzoessäure, 2,3,4-Trihydroxyacetophenon, 6-Aza-2-thiothymidin, Harnstoff, Bernsteinsäure, Adipinsäure, Malonsäure oder deren Mischung. Ganz besonders bevorzugt ist die MALDI-Matrix-Substanz α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure.

Vorzugsweise wird als MALDI-Matrix-Substanz eine Verbindung gewählt, die auf dem Flächengebilde sublimiert und für das menschliche Auge sichtbar ist.

Erfindungsgemäß werden die MALDI-Matrix-Punkte durch Niederschlag der MALDI-Matrix-Substanz aus der Gasphase erzeugt. Niederschlag aus der Gasphase im Sinne der Erfindung ist jedes Verfahren, bei dem die MALDI-Matrix-Substanz aus der Gasphase auf das Flächengebilde übertragen wird. Beispielfhaft seien Kondensation oder Sublimation genannt. Vorzugsweise erfolgt die Auftragung der MALDI-Matrix-Punkte auf das Flächengebilde jedoch durch Sublimation. Sublimation im Sinne der Erfindung beinhaltet, dass die MALDI-Matrix-Substanz als Feststoff in die Gasphase überführt und/oder aus der Gasphase auf dem Flächengebilde feststoffförmig niedergeschlagen wird. Die Sublimation findet vorzugsweise im Vakuum statt .

Besonders bevorzugt wird der Feststoff zur Sublimation erwärmt. Vorzugsweise werden bei dem Niederschlag aus der Gasphase, besonders bevorzugt der Sublimation, mehrere MALDI-Matrix-Substanzen besonders bevorzugt parallel oder sequentiell eingesetzt. Die MALDI-Matrix-Substanzen können zur Herstellung unterschiedlicher MALDI-Matrix-Punkte eingesetzt werden. Es ist aber auch denkbar, dass ein MALDI-Matrix-Punkt eine Substruktur, beispielsweise separat voneinander vorliegende Teilpunkte, aufweist, die jeweils aus einer unterschiedlichen MALDI-Matrix-Substanz aufgebaut sind. Eine Substruktur können aber auch beispielsweise konzentrische Kreise sein, die jeweils aus einer unterschiedlichen MALDI-Matrix-Substanz bestehen.

Vorzugsweise wird der Probenträger während des Niederschlags aus der Gasphase, besonders bevorzugt der Sublimation, von einem Formkörper, einer sogenannten Maske, bedeckt, die durchgehende Ausnehmungen aufweist. Nur im Bereich dieser Ausnehmungen schlägt sich die MALDI-Matrix-Substanz auf dem Flächengebilde nieder und bildet dort einen MALDI-Matrix-Punkt oder Teilpunkt. Diese Maske kann eine beliebige Anzahl von Ausnehmungen aufweisen, die eine beliebige Form haben können. Beispielsweise können die Ausnehmungen rund, rechteckig, quadratisch, dreieckig oder oval sein, um nur eine kleine Anzahl der möglichen Formen zu nennen. Die Form kann zur Unterscheidung der jeweiligen MALDI-Matrix-Substanzen auf einem Flächengebilde herangezogen werden. Das Flächengebilde kann auch ursprünglich von mehreren Masken bedeckt sein, die dann nacheinander entfernt

werden, um beispielsweise auf unterschiedliche Bereiche des erfindungsgemäßen Flächengebildes unterschiedliche MALDI-Matrix-Substanzen aufzutragen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die Maske weitere Ausnehmungen auf, mit denen Informationen auf das Flächengebilde übertragen werden können. Im Bereich dieser Ausnehmungen schlägt sich die MALDI-Matrix-Substanz auf dem Flächengebilde nieder, so dass die Information dort sichtbar wird. Beispiele für Informationen im Sinne der Erfindung sind die Beschriftung der Reihen und Spalten eines Rasters, Kürzel für die verwendete MALDI-Matrix-Substanz aber auch Justierpunkte, die eine exakte Justierung des Flächengebildes in dem entsprechenden Analysegerät erlauben.

Vorzugsweise haben die MALDI-Matrix-Punkte eine Fläche von $1\mu\text{m}^2 - 10\text{mm}^2$. Auf einer derartigen Fläche läßt sich ein Flüssigkeitstropfen absetzen und vorzugsweise so verankern, dass er sich selbst nach unten hängend nicht von dem erfindungsgemäßen Flächengebilde löst.

Weiterhin bevorzugt sind die MALDI-Matrix-Punkte entlang eines exakten Rasters angeordnet, das ein einfaches Ansteuern von Dosier- und/oder Analysierautomaten ermöglicht. Die MALDI-Matrix-Punkte können eine beliebige Form aufweisen. Beispiele für mögliche Formen sind rechteckig, quadratisch, dreieckig oder oval. Die Form der MALDI-Matrix-Punkte kann zu deren Unterscheidung herangezogen werden, weil die Form beispielsweise unter einem Mikroskop im

Massenspektrometer bei der Analyse erkennbar ist. Beispielsweise kann eine bestimmte Form einer bestimmten MALDI-Matrix-Substanz zugeordnet werden. Weiterhin bevorzugt weist ein MALDI-Matrix-Punkt eine Substruktur auf. Diese Substruktur kann aus mehreren von einander isolierten Teilpunkten bestehen, die vorzugsweise jeweils aus einer unterschiedlichen MALDI-Matrix-Substanz bestehen. Die Substruktur kann aber auch mehrere konzentrische Kreistring aufweisen. Insbesondere die Ausführungsform mit mehreren Teilpunkten hat den Vorteil, dass ein einziger Tropfen einer zu analysierenden Substanz, der mit dem MALDI-Matrix-Punkt in Kontakt gebracht wird, gleichzeitig mehrere Teilpunkte benetzt und somit an einem MALDI-Matrix-Punkt Untersuchungen mit mehreren verschiedenen Matrix-Substanzen durchgeführt werden können.

Vorzugsweise stellen die MALDI-Matrix-Punkte oder Teilpunkte Bereiche dar, die besser benetzbar als ihre Umgebung sind und die jeweils von einem schlechter benetzbaren, vorzugsweise ultraphoben Bereich vollständig umschlossen sind. Durch diese Ausführungsform ist es möglich, einen Flüssigkeitstropfen an einem ganz bestimmten Ort abzulegen und dort vergleichsweise fest zu verankern.

Vorzugsweise weist die kristalline Struktur der MALDI-Matrix-Punkte oder Teilpunkte eine Kristallit-Korngröße $< 1 \mu\text{m}$ auf. Diese bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hat beispielsweise den Vorteil, dass die MALDI-Matrix-Punkte von der zu testenden Substanz sehr gut und gleichmäßig angelöst werden und/oder dass ein sehr gutes Signal resultiert.

● Ultraphob im Sinne der Erfindung bedeutet, dass der Kontaktwinkel eines Wasser- und/oder Öltropfens, der auf einer ultraphoben Oberfläche liegt, mehr als 150° , vorzugsweise mehr als 160° und am meisten bevorzugt mehr als 170° beträgt und/oder der Abrollwinkel 10° nicht überschreitet. Als Abrollwinkel wird der Neigungswinkel einer grundsätzlich planen aber strukturierten Oberfläche gegen die Horizontale verstanden, bei dem ein stehender Wasser- und/oder Öltropfen mit einem Volumen von $10 \mu\text{l}$ aufgrund der Schwerkraft bei einer Neigung der Oberfläche bewegt wird. Solche ultraphoben Oberflächen sind zum Beispiel in der WO 98/23549, WO 96/04123, WO 96/21523, WO 00/39369, WO 00/39368, WO 00/39239, WO 00/39051, WO 00/38845 und WO 96/34697 offenbart, die hiermit als Referenz eingeführt werden und somit als Teil der Offenbarung gelten.

● In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die ultraphoben Bereiche eine Oberflächentopographie auf, bei der die Ortsfrequenz der einzelnen Fourierkomponenten und deren Amplitude $a(f)$ ausgedrückt durch das Integral $S(\log(f)) = a(f) \cdot f$ errechnet zwischen den Integrationsgrenzen $\log(f_1/\mu\text{m}^{-1}) = -3$ und $\log(f_2/\mu\text{m}^{-1}) = 3$ mindestens $0,3$ beträgt und die aus einem hydrophoben oder insbesondere oleophoben Material besteht oder mit einem haltbar hydrophobierten und/oder insbesondere haltbar oleophobierten Material beschichtet sind. Eine solche ultraphobe Oberfläche ist in der internationalen Patentanmeldung WO 99/10322 beschrieben, die hiermit als Referenz eingeführt wird und somit als Teil der Offenbarung gilt.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Herstellung von Flächengebilden, mit einer Vielzahl von MALDI-Matrix-Punkten. Dieses Flächengebilde ist deshalb ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Flächengebilde als Einmalartikel gestaltet. Für diese Ausführungsform ist insbesondere ein mehrschichtiges Flächengebilde mit einer ersten Schicht mit einer ultraphoben Oberfläche und einer Trägerschicht geeignet, wobei die erste Schicht auf der Trägerschicht reversibel aufgebracht ist und die maximale lokale Abweichung des Flächengebildes von der Planheit $< 100\text{ }\mu\text{m}$, besonders bevorzugt $< 20\text{ }\mu\text{m}$ auf einer Länge von 100 mm beträgt.

Dieses Flächengebilde hat den Vorteil, dass die erste Schicht mit der ultraphoben Oberfläche nach einmaliger oder mehrmaliger Verwendung von der Trägerschicht abgelöst werden kann und durch eine neue erste Schicht ersetzt werden kann, so dass ausgeschlossen ist, dass diese erste Schicht durch vorhergehende Experimente kontaminiert worden ist. Die erste Schicht mit der ultraphoben Oberfläche ist als Einmalartikel besonders günstig herzustellen. Durch die erfindungsgemäß definierte Planheit ist sichergestellt, dass das Flächengebilde in allen gängigen massenspektrometrischen und/oder optischen Analysegeräten einsetzbar ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Flächengebildes ist die erste Schicht auf die Trägerschicht aufgeklebt.

Weiterhin bevorzugt besteht zwischen der ersten Schicht und der Trägerschicht ein elektrischer Kontakt. Diese Ausführungsform ist insbesondere bei massenspektroskopischen Analysen von Vorteil.

Das erfindungsgemäße Flächengebilde ist mannigfaltig einsetzbar, vorzugsweise eignet es sich jedoch bei massenspektroskopischen und/oder optischen Analysen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein langzeitstables Flächengebilde mit mindestens einem MALDI-Matrix-Punkt, dadurch gekennzeichnet, dass es von einem Hohlkörper umgeben ist, in dem Vakuum herrscht und der aus einem wasserdampfundurchlässigen Material besteht.

Bezüglich des Flächengebildes und der MALDI-Matrix-Punkte wird auf die oben stehende Offenbarung verwiesen.

Erfindungsgemäß wird das Flächengebilde von einem Hohlkörper vollständig umgeben, in dem Vakuum, vorzugsweise ein Druck < 100 mbar herrscht.

Weiterhin erfindungsgemäß ist der Hohlkörper aus einem gasundurchlässigen, insbesondere wasserdampfundurchlässigen, Material gefertigt.

Vorzugsweise ist der Hohlkörper lichtundurchlässig.

Vorzugsweise ist der Hohlkörper aus einer Kunststoffolie gefertigt, die an mindestens einer Seite gesiegelt ist. Besonders bevorzugt weist die Kunststoffolie eine Gasbarriereschicht, insbesondere eine Wasserdampfbarriereschicht auf.

Vorzugsweise ist diese Barriereschicht aus Aluminium.

Das erfindungsgemäße Flächengebilde hat den Vorteil, daß insbesondere die MALDI-Matrix-Punkte auf dem Flächengebilde über einen Zeitraum von zumindest mehreren Monaten keinem oder nur einem geringen Alterungsprozeß unterliegen.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispiel 1 und Figur 1 – 5 erläutert. Diese Erläuterungen sind lediglich beispielhaft und schränken den allgemeinen Erfindungsgedanken nicht ein.

Figur 1 zeigt den Querschnitt eines erfindungsgemäßen mehrschichtigen Flächengebildes.

Figur 2 zeigt die Oberfläche eines erfindungsgemäßen Flächengebildes.

Figur 3 zeigt eine Maske zur Durchführung des Verfahrens zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Flächengebildes.

Figur 4 zeigt einen MALDI-Matrix-Punkt erhältlich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Figur 5 zeigt die Verwendung des erfindungsgemäßen Flächengebildes bei der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und MALDI-Untersuchungen.

Beispiel 1:

Ein Probenträger wurde wie folgt hergestellt:

Ein walzpoliertes Al-Blech (99,9%) mit einer Fläche von 26x76mm² und einer Dicke von 0,15 mm wurde bei Raumtemperatur mit Chloroform (p.a.) anschließend 20s in wässriger NaOH (5g/l) bei 50°C entfettet.

Danach wurde 20s in H₃PO₄ (100g/l) vorgebeizt, 30s in destilliertem Wasser gespült und 90s in einer Mischung von HCl/H₃BO₃ (je 4g/l) bei 35°C und 120mA/cm² bei 35V Wechselspannung elektrochemisch gebeizt.

Nach 30s Spülung in Wasser und 30s alkalischer Spülung in wässriger NaOH (5g/l) wurde erneut 30s in destilliertem Wasser gespült und anschließend 90s in H₂SO₄ (200g/l) bei 25°C mit 30mA/cm² bei 50V Gleichspannung anodisch oxidiert.

Danach wurde 30s in destilliertem Wasser, dann 60s bei 40°C in NaHCO₃ (20 g/l), dann wieder 30s in destilliertem Wasser gespült und 1 Stunde bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

Das so behandelte Blech wurde mit einer etwa 50nm dicken Goldschicht durch Kathodenzerstäubung im Hochvakuum beschichtet. Schließlich wurde die Probe 24 Stunden durch Tauchen in eine Lösung des Thiols CF₃-(CF₂)₇-(CH₂)₂-SH in Benzotrifluorid (p.a., 1g/l) bei Raumtemperatur in einem geschlossenem Gefäß mit

einer Monolage beschichtet, anschließend mit Benzotrifluorid (p.a.) gespült und getrocknet.

Die Oberfläche weist für Wasser einen statischen Randwinkel von 178° auf. Bei einer Neigung der Oberfläche um $< 2^\circ$ rollt ein Wassertropfen des Volumens $10\mu\text{l}$ ab.

Auf den Probenträger wurden Matrix-Punkte wie folgt sublimiert:

In einer Hochvakuumverdampfungsanlage (Edwards E306) werden $0,5\text{ g}$ α -Cyano-4-hydroxymethylsäure in einen heizbaren Quarztiegel mit einer nach oben gerichteten Öffnung von 10 mm Durchmesser gefüllt. Im Abstand von 150 mm wird ein Probenträger montiert, der mit einer Maske gemäß Figur 3 bedeckt ist. Nach Abpumpen auf einen Basisdruck $< 10^{-5}\text{ mbar}$ wird der Quarztiegel mit Hilfe von außen liegenden Wicklungen aus Wolframdraht beheizt.

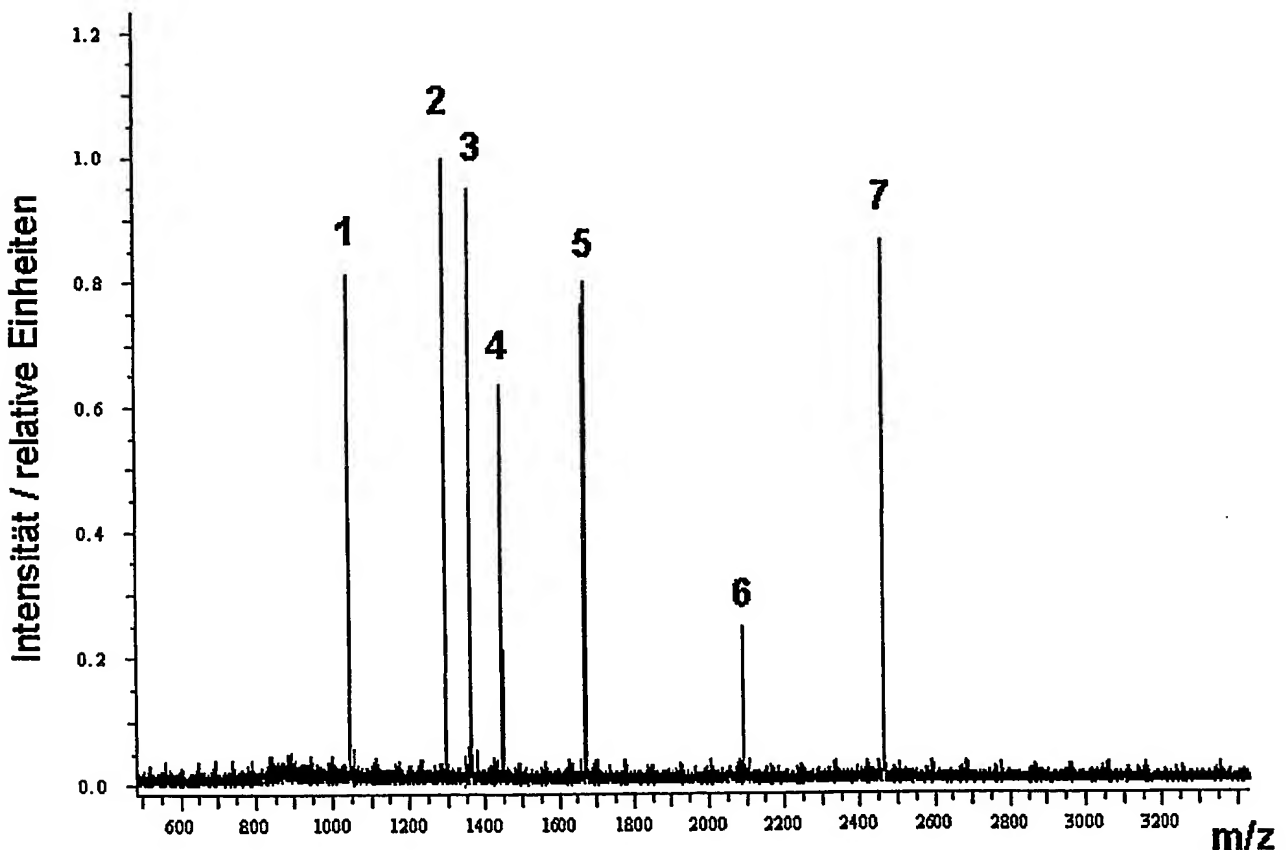
Die Temperatur des Feststoffs wird in der Pulverschüttung mit einem Thermoelement auf 180°C geregelt. Die Schichtdicke des abgeschiedenen Films aus α -Cyano-4-hydroxymethylsäure wird mit Hilfe eines Schwingquarz-Schichtdickenmessgerätes bestimmt, das zuvor mit einer absoluten Schichtdickenbestimmung (z.B. Rasterkraftmikroskop) geeicht wird. Die Sublimation wird bei einer Schichtdicke von $1\text{ }\mu\text{m}$ abgebrochen.

Die erhaltenen MALDI-Matrix-Punkte sind beispielhaft in Figur 4 gezeigt. Ein Massenspektrum dieses MALDI-Matrix-Punkt es wurde wie folgt erhalten:

MALDI Massenspektrum der einfach protonierten Peptide (1-7): Humanes Angiotensin I und II, Substanz P-methylester, Neurotensin (Aminosäuren 1-11), Neurotensin, ACTH (Aminosäuren 1 - 17) und ACTH (Aminosäuren 18 – 39), aufgenommen von einem präpariertem MALDI-Matrix-Punkt mit einem Durchmesser von $800\text{ }\mu\text{m}$. Die Peptide wurden für die massenspektrometrische Analyse wie folgt präpariert: $0.5\mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung, die jeweils 5 fmol der Peptide 1-6, 1 fmol des Peptids 7 sowie ein Volumenprozent Trifluoressigsäure und 1 mM des nichtionischen Detergenz n-Octyl- β -D-glukopyranosid enthielt, wurden auf den MALDI-Matrix-Punkt aufpipettiert. Nach dem das Lösungsmittels vollständig

abgedampft war, wurde die so präparierte Probe einmal gewaschen. Hierzu wurde der gesamte Probenräger für 2 Sekunden in eine 0.1 %ige Trifluoressigsäure eingetauscht und unmittelbar danach, für die Abtrennung verbleibender Flüssigkeitsreste, für 10 Sekunden in einen Stickstoffgasstrom (2,5 bar) gehalten. Das Massenspektrum positiver Molekülonen wurde in einem MALDI Flugzeitmassenspektrometer der Firma Bruker Daltonik, Bremen (Scout-MTP Autoflex) im Reflektorbetriebsmodus und mit zeitlich verzögerter Ionenextraktion (Verzögerungszeit: 70 Nanosekunden) und 20 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden 100 Einzelschussspektren aufsummiert.

Das Ergebnis ist in der folgenden Graphik dargestellt.



Im folgenden werden die Figuren 1 bis 5 beschrieben.

Figur 1 zeigt das Flächengebilde 1, das aus einer ersten Schicht 2 mit einer ultraphoben Oberfläche 3 und einer Trägerschicht 4 besteht. Die erste Schicht 2 ist auf der Trägerschicht mittels einer Klebschicht 5 fixiert. Der Fachmann erkennt, dass die Klebschicht 5 nicht notwendigerweise vorhanden sein muß. Die Klebschicht 5 besteht aus einem elektrisch leitenden Material, so dass ein elektrischer Kontakt zwischen der ersten Schicht 2 und dem Trägermaterial besteht.

Figur 2 zeigt ein erfindungsgemäßes Flächengebilde, auf das mehrere MALDI-Matrix-Punkte 6 rasterförmig sublimiert wurden. Die MALDI-Matrix-Punkte in den jeweiligen Reihen 1-4 weisen unterschiedliche Formen auf, die dem Anwender symbolisieren, dass in jeder Reihe unterschiedliche MALDI-Matrix-Substanzen verwendet wurden. Der MALDI-Matrix-Punkt 2D ist vergrößert dargestellt, so dass erkennbar ist, dass er aus vier Teilpunkten 8 besteht. Diese Teilpunkte 8 sind aus jeweils unterschiedlichen MALDI-Matrix-Substanzen aufgebaut, so daß an diesem MALDI-Matrix-Punkt vier unterschiedliche Analysen vorgenommen werden können. Unterhalb des MALDI-Matrix-Punktes 4D ist zusätzlich eine Beschriftung 7 auf das Flächengebilde aufgetragen worden, die den Benutzer über die in dieser Reihe verwendete MALDI-Matrix-Substanz informiert. Zusätzlich weist das Flächengebilde zwei Zentrierkreuze 9 auf.

Die Beschriftung und die Zentrierkreuze werden wie die MALDI-Matrix-Punkte auf das Flächengebilde sublimiert, indem eine Maske über das Flächengebilde gelegt wird, die entsprechende Ausnehmungen aufweist. Der Fachmann erkennt, dass die Reihen 1 – 4 des Rasters nacheinander hergestellt wurden.

Figur 3 zeigt die Maske mit 8 x 8 Öffnungen 12 im Durchmesser von 0,8 mm mit einem Abstand der Mittelpunkte von 2,25 mm (nicht maßstabsgetreu).

Figur 4 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Matrixspots, der mit der Maske aus Figur 3 erhalten wurde.

Die sehr vorteilhafte Verwendung der erfindungsgemäßen Probenträger bei der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und MALDI Untersuchung (LC-MALDI Kopplung) zeigt die **Figur 5**.

Häufig werden Substanzgemische vor einer MALDI Untersuchung zunächst chromatographisch getrennt. Beispiel sind Gemische von Peptiden, die durch einen enzymatischen (z.B. Trypsin) Peptidabbau erzeugt wurden. Nach der chromatographischen Trennung werden die Fraktionen des Eluates dann auf die MALDI-Matrix-Punkte 6 des Probenträgers 1 aufgebracht.

In dem vorliegenden Beispiel werden dazu MALDI-Matrix-Punkte 6 verwendet, die sehr eng aneinander liegen, jedoch noch von einem ultraphoben Bereich vollständig umschlossen sind. Vorzugsweise betragen die Abstände (gemessen von Mittelpunkt zu Mittelpunkt) der MALDI-Matrix-Punkte das 1,5 fache von deren Durchmesser.

Durch Verwendung von MALDI-Matrix-Punkten, die durch Sublimation über Masken erzeugt wurden, ist deren Ort und deren Größe sehr genau definiert. Auf diese Weise kann erreicht werden, dass die Flüssigkeit aus der Austrittsöffnung 11 der LC Säule 10 zum Aufbringen auf die MALDI-Matrix-Punkte kontinuierlich auslaufen kann. Ein gesondertes Sammeln der Fraktionen in Gefäßen mit anschließendem Aufpipettieren auf die Matrix-Punkte oder ein diskontinuierliches Erzeugen von Fraktionen durch Verweilen der Austrittsöffnung über einem MALDI-Matrix-Punkt und anschließendes schnelles Weiterbewegen zum nächsten MALDI-Matrix-Punkt entfällt.

Der Probenträger 1 wird in einer konstanten Geschwindigkeit unter der Austrittsöffnung 11 hinweg bewegt. Jeder MALDI-Matrix-Punkt fängt nun ein konstantes Volumen der Flüssigkeit ein, die aus der Austrittsöffnung abgegeben wird. Gestartet wird der Prozess am Punkt A und verläuft mäanderförmig über alle Punkte hinweg zum Punkt E. Die MALDI-Matrix-Punkte enthalten anschließend das gesamte Eluat der Chromatographie auf den MALDI-Matrix-Punkten A bis E in Fraktionen, die dem konstanten Volumen entsprechen, das jeder MALDI-Matrix-Punkt aufnimmt. Durch Änderung der Geschwindigkeit mit der der Träger 1 unter der Austrittsöffnung 11 verschoben wird, kann dieses Volumen geändert werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Flächengebildes, vorzugsweise eines Probenträgers, mit einer Vielzahl von MALDI-Matrix-Punkten, dadurch gekennzeichnet, dass die MALDI-Matrix-Punkte durch Niederschlag einer MALDI-Matrix-Substanz aus der Gasphase, vorzugsweise Sublimation, auf den Probenträger aufgetragen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger während des Niederschlags aus der Gasphase von einer Platte abgedeckt wird, die durchgehende Ausnehmungen aufweist, deren Querschnittsfläche jeweils der Querschnittsfläche der MALDI-Matrix-Punkte entspricht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Platte mindestens eine weitere durchgehende Ausnehmung aufweist, mit der Information durch Niederschlag der MALDI-Matrix-Substanz aus der Gasphase auf den Probenträger übertragen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Information beispielsweise die Zusammensetzung der MALDI-Matrix-Substanz und/oder Justierpunkte sind.
5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die MALDI-Matrix-Punkte entlang eines Rasters angeordnet sind.
6. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die MALDI-Matrix-Punkte Substrukturen aufweisen.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die MALDI-Matrix-Punkte in mehrere vorzugsweise voneinander isolierte Teilpunkte aufgeteilt sind.

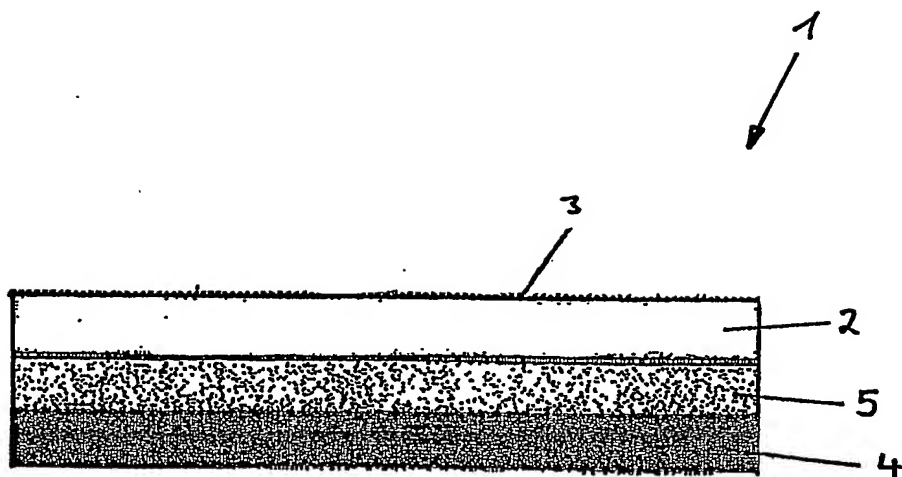
8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass auf einen Probenträger unterschiedliche MALDI-Matrix-Substanzen aufgetragen werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest mehrere MALDI-Matrix-Punkte oder -Teilpunkte jeweils aus einer MALDI-Matrix-Substanz aufgebaut sind.
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als eine MALDI-Matrix-Substanz α -Cyano-4-hydroxymethylsäure eingesetzt wird.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger eine ultraphobe Oberfläche aufweist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die MALDI-Matrix-Punkte oder -Teilpunkte hydrophile Bereiche darstellen, die von ultraphoben Bereichen vollständig umschlossen sind.
13. Flächengebilde erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 12.
14. Flächengebilde nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es mehrschichtig ist.
15. Flächengebilde (1) nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es eine erste Schicht (2) mit einer ultraphoben Oberfläche (3) und eine Trägerschicht (4) aufweist.
16. Flächengebilde nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Schicht (2) auf einer Trägerschicht (4) reversibel aufgebracht ist und die maximale lokale Abweichung des Flächengebildes von der Planheit $< 100 \mu\text{m}$ auf einer Länge von 100 mm beträgt.

17. Flächengebilde nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Schicht (2) auf die Trägerschicht (4) aufgeklebt ist.
18. Flächengebilde nach einem der Ansprüche 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der ersten Schicht (2) und der Trägerschicht (4) ein elektrischer Kontakt besteht.
19. Langzeitstabiles Flächengebilde mit mindestens einem MALDI-Matrix-Punkt, dadurch gekennzeichnet, dass es von einem Hohlkörper umgeben ist, in dem Vakuum herrscht und der aus einem wasserdampfundurchlässigen und vorzugsweise lichtundurchlässigem Material besteht.
20. Flächengebilde nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich biologisches Material auf dem MALDI-Matrix-Punkt aufweist.

Zusammenfassung

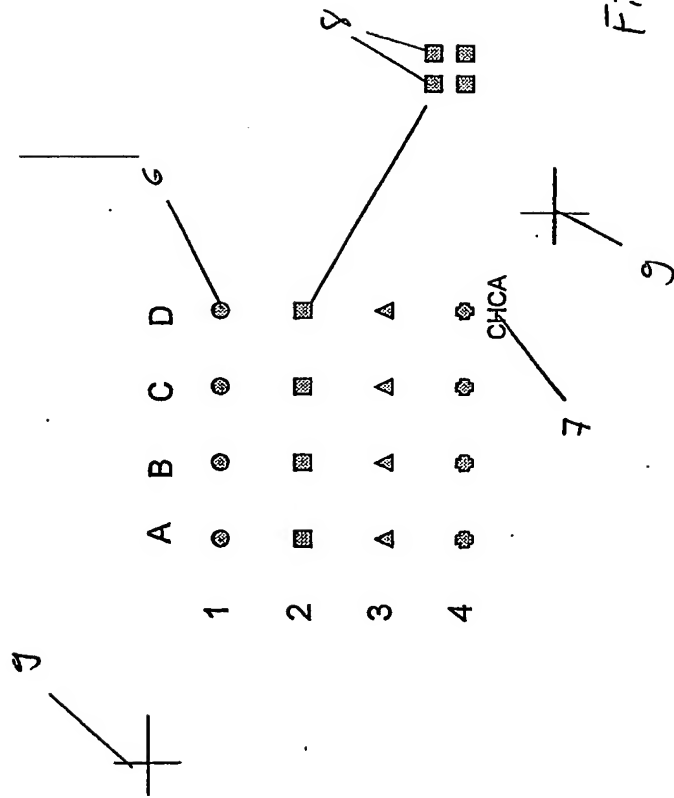
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers mit einer Vielzahl von MALDI-Matrix-Punkten, ein Flächengebilde erhältlich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie ein langzeitstabiles Flächengebilde.

1/5



Figur 1

2/5



3/5

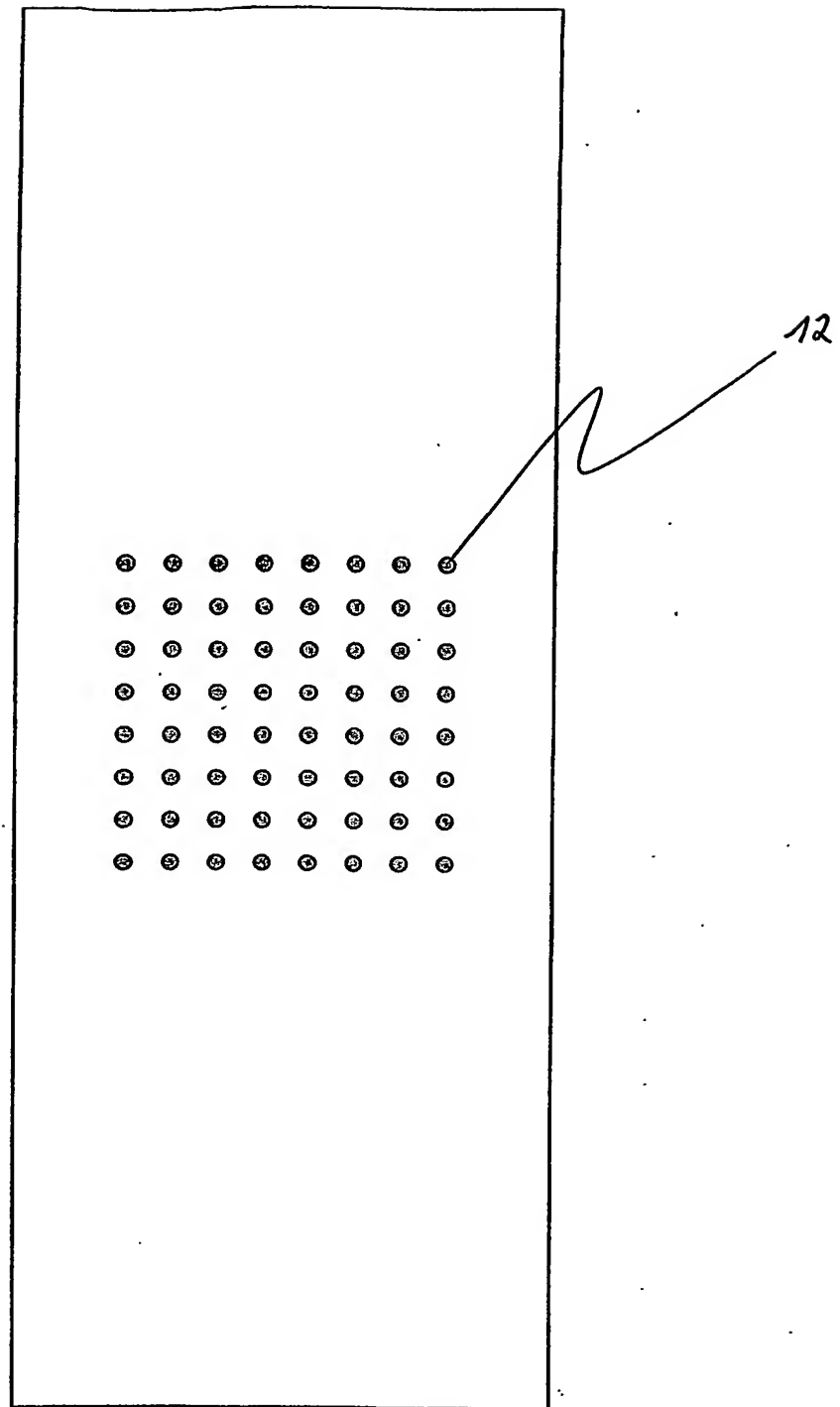
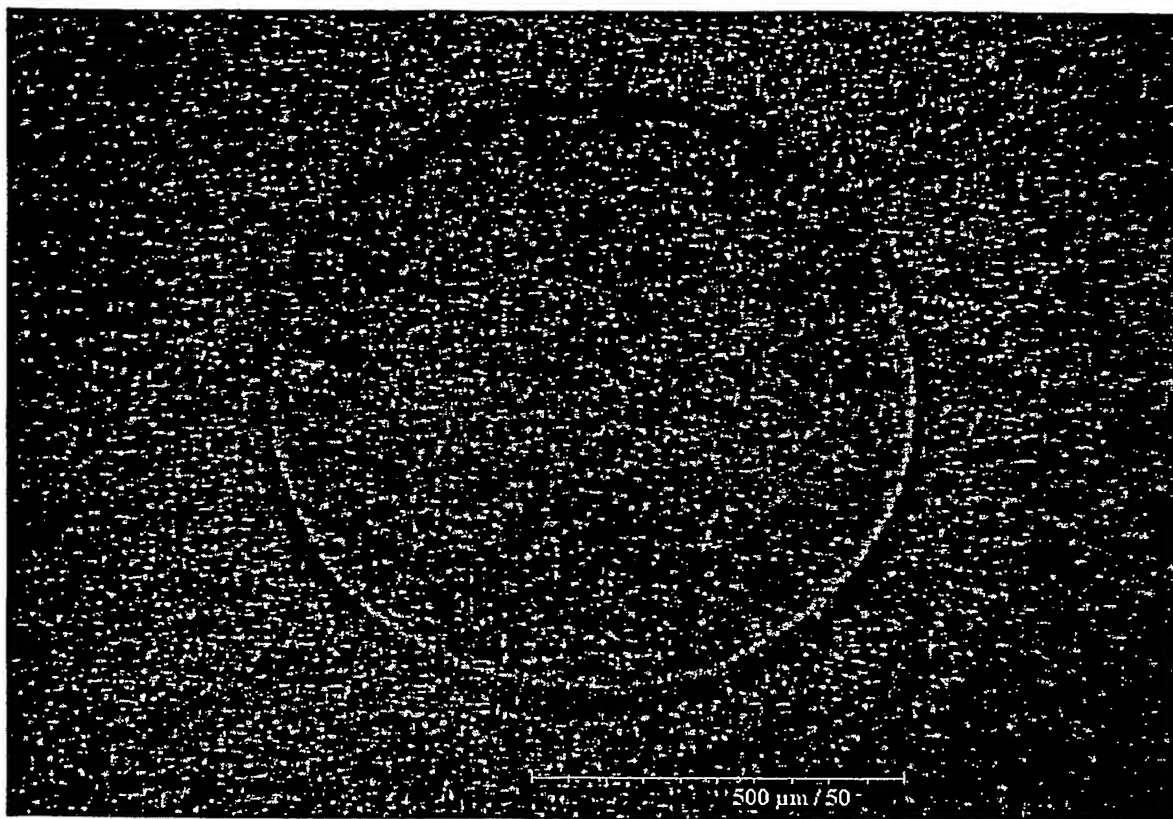


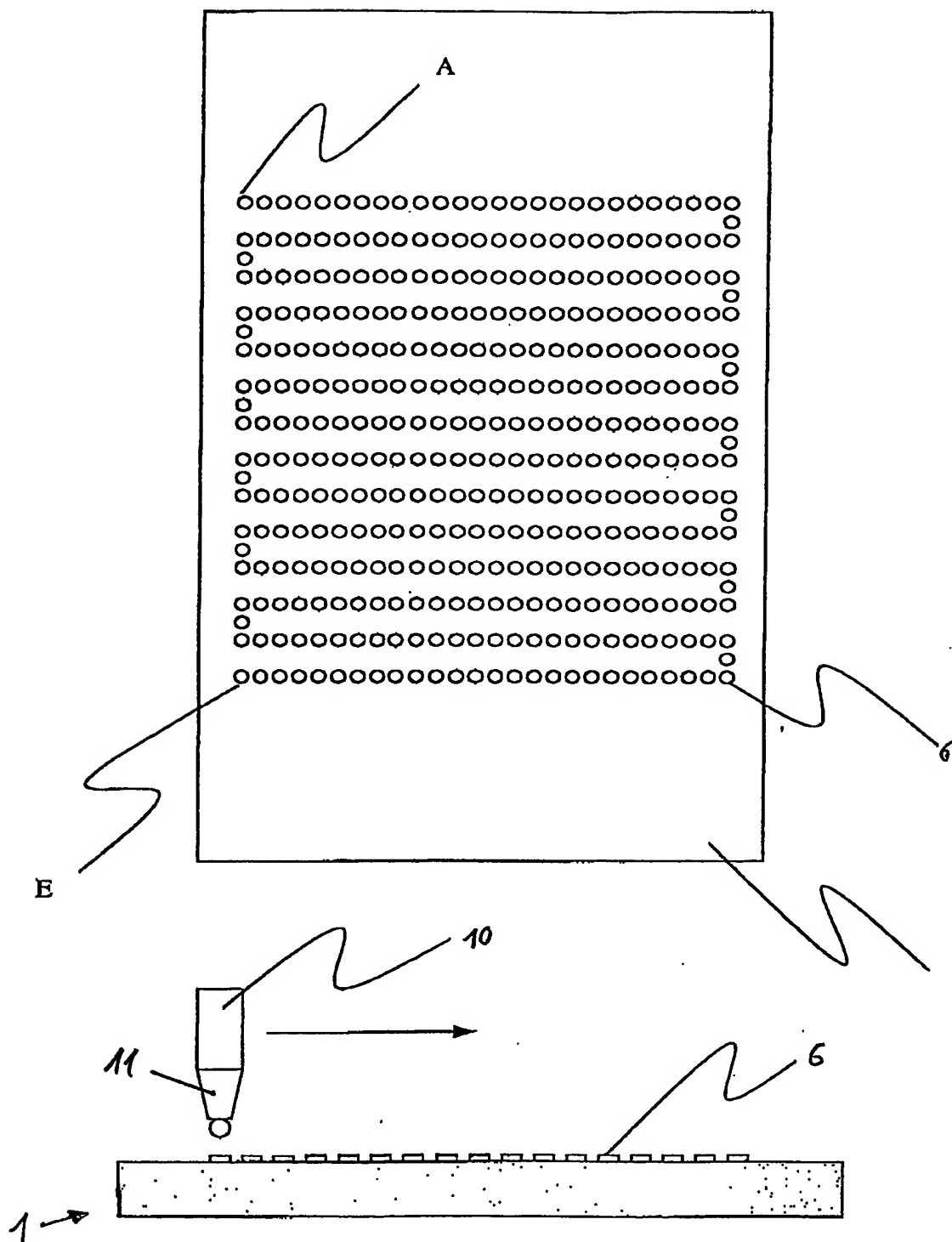
Fig. 3

4/5



Figur 4

5/5



Figur 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.